

(54) ANTI-CK-M MONOCLONAL ANTIBODY AND PRODUCTION THEREOF

(11) 63-49095 (A) (43) 1.3.1988 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-191899 (22) 15.8.1986
 (71) UNITIKA LTD (72) TADAO SUZUKI(1)
 (51) Int. Cl⁴. C12P21/00, C07K15/04, C12N15/00, G01N33/536, G01N33/577//C12N5/00, C12Q1/00(C12P21/00, C12R1:91)

PURPOSE: To readily measure CK-MB isozyme with good sensitivity, by producing a monoclonal antibody reactive with creatine kinase and capable of inhibiting creatine kinase M subunit activity.

CONSTITUTION: Lymphocytes prepared from an animal immunized with creatine kinase are fused to myelomatous cells to give a hybridoma strain having the ability to produce a monoclonal antibody, reactive with creatine kinase and capable of inhibiting creatine kinase M subunit activity. The resultant hybridoma strain is then cultivated to collect the aimed monoclonal antibody, reactive with the creatine kinase and capable of inhibiting the creatine kinase M subunit activity from the resultant culture.

(54) PRODUCTION OF EPSILON-POLY-L-LYSINE

(11) 63-49097 (A) (43) 1.3.1988 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-192158 (22) 19.8.1986
 (71) CHISSO CORP (72) YUTAKA MORITA(1)
 (51) Int. Cl⁴. C12P21/02, C08G69/10//C12P21/02, C12R1:465)

PURPOSE: To produce the titled substance at a low cost, by preparing a variant strain capable of producing a remarkably amount of the titled substance and cultivating the resultant variant strain in a culture medium obtained by adding L-lysine or together with a saccharide thereto.

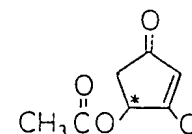
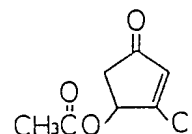
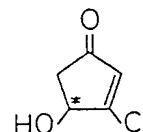
CONSTITUTION: Streptomyces albulus subsp. lysinopolymerus No.346-D strain is treated with chloramphenicol to give a plasmid amplifying variant strain 50833 (FERM-P No.1110) capable of producing a remarkable amount of epsilon-poly-L-lysine. The resultant variant strain 50833 is then inoculated into a culture medium obtained by adding L-lysine or together with a saccharide thereto and cultivated. After removing the microbial cells, the culture fluid is passed through a column, purified and concentrated to crystallize the aimed epsilon-poly-L-lysine with an organic solvent.

(54) PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE 3-CHLORO-4-HYDROXY-2-CYCLOPENTENONE

(11) 63-49099 (A) (43) 1.3.1988 (19) JP
 (21) Appl. No. 61-190934 (22) 14.8.1986
 (71) FUJI YAKUHI KOGYO K.K. (72) TEI TAKEUCHI(1)
 (51) Int. Cl⁴. C12P41/00, C07C49/707

PURPOSE: To produce 3-chloro-4-hydroxy-2-cyclopentenone with is a synthetic intermediate for punaglandin at a low cost, by asymmetrically hydrolyzing acetoxy-cyclopentenone with an enzyme or microorganism.

CONSTITUTION: A compound expressed by formula II is asymmetrically hydrolyzed with a hydrolase or microorganism, preferably swine hepatic esterase, acetylcholine esterase, etc., in a buffer solution or a mixture solution thereof with an organic solvent to prepare 3-chloro-4-hydroxy-2-cyclopentenone expressed by formula I (* indicates optical active center, same applies hereinafter). Alternatively, an optically active compound, expressed by formula III and obtained by asymmetric hydrolyzing the above-mentioned compound expressed by formula II and removing the hydrolyzate is hydrolyzed with an enzyme or microorganism to produce the 3-chloro-4-hydroxy-2-cyclopentenone expressed by formula I after completing the reaction, the reaction solution is filtered and extracted with an organic solvent. The organic layer is then purified by column chromatography to afford the aimed compound expressed by formula I.



⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A)

昭63-49095

⑫ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)3月1日

C 12 P 21/00
C 07 K 15/04
C 12 N 15/00
G 01 N 33/536
33/577
// C 12 N 5/00
C 12 Q 1/00
(C 12 P 21/00
C 12 R 1/91)

6712-4B
8318-4H
7115-4B
C-7906-2G
7906-2G
7115-4B
8412-4B

審査請求 未請求 発明の数 2 (全7頁)

⑭ 発明の名称 抗CK-Mモノクローナル抗体及びその製造法

⑮ 特 願 昭61-191899

⑯ 出 願 昭61(1986)8月15日

⑰ 発 明 者 鈴木 直 生 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究
所内

⑱ 発 明 者 永 来 美 保 子 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究
所内

⑲ 出 願 人 ユニチカ株式会社 兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地

日 月 年

1. 発明の名称

抗CK-Mモノクローナル抗体及びその製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) クレアチンキナーゼと反応し、クレアチンキナーゼMサブユニット活性を阻害するモノクローナル抗体。
- (2) クレアチンキナーゼにより免疫された動物より調製したリンパ球と融合することにより得られ、クレアチンキナーゼと反応し、クレアチンキナーゼMサブユニット活性を阻害するモノクローナル抗体産生能を有するハイブリドーマ細胞株を培養し、培養物からクレアチンキナーゼと反応し、クレアチンキナーゼMサブユニット活性を阻害するモノクローナル抗体を採取することを特徴とするクレアチンキナーゼと反応し、クレアチンキナーゼMサブユニット活性を阻害するモノクローナル抗体の製造法。

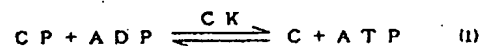
3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、生体液中のクレアチンキナーゼ(Creatine Kinase EC 2.7.3.2; 以下CKと略記する。)のMBアイソザイムの定量に用いることができ、CKと反応し、かつCK-Mサブユニット活性を阻害するモノクローナル抗体(以下抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体と略記する。)及びその製造法に関するものである。

(従来の技術)

CKは、(1)式の左右両方向の反応を触媒する酵素である。



(略号は、CP:クレアチンリン酸、C:クレアチン、ADP:アデノシン二リン酸、ATP:アデノシン三リン酸である。)

CKには、2つのサブユニットの組合せにより、3つのアイソザイムが存在することが知られてお

り、それらは各々CK-MM、CK-MB、CK-BBであり、CK-MMは主に骨格筋や心筋などの筋肉に、CK-MBは心筋に、CK-BBは主に脳及び腎などの臓器に存在している。この中で、CK-MBは心筋に特異的に存在するので、その特異的測定は心筋梗塞の診断において特に有用なマーカーであることが明らかにされている。

臨床検査の領域においてCK活性の測定は、筋疾患、神経性疾患、中枢神経系疾患、精神病、心疾患などの診断に日常的に測定されている重要な項目の1つで、従来から種々のCK測定法が提案されてきた。その1つは、左方向の活性を測定するという方法で、これらの中には、①CPの加水分解で生ずる無機リン酸を測定する方法、②ADPをビルビン酸キナーゼ(以下PKと略記する。)と乳酸脱水素酵素の作用で還元型β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(以下NADHと略記する。)に導き、吸収減少として測定する方法、③ADPをPKでビルビン酸に導き、次いで2,4-ジニトロフェニルヒドラジンとの反応で生成し

たヒドラゾンを測定する方法などがある。

また、右方向の活性を測定する方法には、①生成したCを色素と反応させて比色する、あるいは蛍光を測定する方法、②ルシフェラーゼを用いる方法(特開昭51-41597号公報、特開昭55-120796号公報、特開昭56-26200号公報、特開昭57-105199号公報参照。)、③ホスホグリセリン酸キナーゼとグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼを用いる方法(特公昭59-34119号公報、特開昭56-155000号公報参照。)、④ヘキソキナーゼとグルコース-6-リン酸脱水素酵素(以下G6PDHと略記する。)を用いる方法、⑤グルコキナーゼ(以下G6cKと略記する。)とG6PDHを用いる方法などがある。

しかし、これらの方法は、3つのアイソザイムを区別して測定することができないので、心筋梗塞の有用なマーカーであるCK-MBを特異的に測定する方法がいくつか提案されている。まず、⑥CK-M活性を特異的に阻害する抗体を加えて、

CK-B活性のみを①～⑤の方法で測定する方法(特公昭56-19239号公報、特公昭58-20274号公報参照。)がある。この場合、CK-BBとの区別がつかないが、通常血清中のCK-BBの量は無視できる。また、⑦イオン交換樹脂でCK-MBアイソザイムを分離して、CK-MB活性を①～⑤の方法で測定する方法(特開昭54-65096号公報、特開昭54-163886号公報参照。)。さらに、⑧酵素活性ではなく、免疫測定法でクンバク質量として測定する方法(クリニカルケミストリー(Clinical chemistry), Vol. 29, 1232頁(1983)参照)などが報告されている。これらの方法の中で、操作が簡便なこと、総CK活性との比較が容易である点で、⑨の免疫阻害法が最も有用である。この方法では、抗体はMMアイソザイムを抗原として免疫して得られる抗血清から分離したポリクローナル抗体が用いられている。

一方、1975年にケーラー(Köhler)とミルシュタイン(Milstein)は、免疫されたマウスの

脾細胞のリンパ球と骨髓腫細胞(ミエローマ)を融合させることによって得られる融合細胞(ハイブリドーマ)を用いて、単一、均質な抗体(モノクローナル抗体)を製造しうることを示した(ネイチャー(Nature), 256巻, 495頁(1975))。この報告以来、種々のハイブリドーマ及びモノクローナル抗体について報告がされてきた(例えば、コプロウスキー(Koprowski), プロシーディングオブナショナルアカデミックサイエンスユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)75巻, 3938頁(1978); ガルフル(Galfre)ら, ネイチャー(Nature), 266巻, 550頁(1977); ケーラー(Köhler)ら, ユーロピアンジャーナルオブイムノロジー(Eur. J. Immunol.), 6巻, 511頁(1976))が、抗CK-M阻害モノクローナル抗体については、全く何も記載されていないし、また、その創製に成功したとの報告もなされていない。

(発明が解決しようとする問題点)

前記したポリクローナル抗体を得るためには、

抗原を高度に精製する必要があるが、MM抗原は高度な精製が困難で、そのため、エタノール沈殿で得られた粗酵素はDEAEセファセル、CM-セルロース、フェニルセファロース、ブルーセファロースの各クロマトグラフィーを要する。特に免疫阻害法においては、アイソザイムの相互分離が重要であり、分離が不完全であると、例えば、MM抗原の中にMB抗原が混入した抗原を用いて免疫した抗体は、Bサブユニットを阻害する抗体も生成していると考えられ、このような抗体を阻害剤として使用すれば、MBアイソザイムのBサブユニットも阻害し、異常に低い測定値を与え、正しい測定ができない。

さらに、ポリクローナル抗体を得るためには、その高度に精製されたMM抗原が常に多量に必要であり、また、被免疫動物の個体差によるロットのバラツキも大きい。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、このような問題点を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、CK-MM又はCK-M

Bを抗原として動物を免疫し、その動物のリンパ球と骨髓腫細胞(ミエローマ)とを融合させることにより得られたハイブリドーマ細胞株が、大量の抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体を生産し、しかも、この抗体を用いて免疫阻害法でCK-MBアイソザイムを簡便で感度よく測定できることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体及び抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体産生能を有するハイブリドーマ細胞株を培養し、培養物から抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体を採取することと特徴とする抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体の製造法を要旨とするものである。

本発明の抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体の理化学的性質の一例を示す。

(1) 作用

CKに作用して抗原抗体反応が生じ、CK-Mサブユニット酵素活性を阻害する。

(2) 抗原抗体反応特異性

抗CK-M抗体産生リンパ球とミエローマ細胞との融合により創製した融合細胞である。

(2) 形態

ミエローマ細胞とほぼ同様の形態を示す。
例えば、大きさは10~20μmである。

(3) 機能

単一の抗原決定基を認識する抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体を定常的に生産する。

(4) 増殖性

ミエローマ細胞とほぼ同様の増殖性を示す。
すなわち、72時間で約10倍に増殖する。

(5) 保存性

-120℃以下で極めて容易に長期間保存可能である。

(6) 最適増殖条件

温度37℃、pH7.2

(7) 増殖範囲

温度32~42℃、pH6.5~7.8で増殖可能である。

CKサブユニットと反応する。

(3) 最適pH

6~9

(4) 安定pH範囲

3~11

(5) 力価の測定方法

イムノアッセイによって検出されうる希釈倍率により測定する。

(6) 作用適温の範囲

20~40℃

(7) 失活の条件

100℃、10分の加熱で失活する。

(8) 分子量

140,000~180,000

本発明のモノクローナル抗体を得るには、まず、抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体産生能を有するハイブリドーマ細胞株を得る。このハイブリドーマ細胞株としては、例えば、次の細胞学的性質を示す細胞株があげられる。

(1) 由来

この細胞株を得るには、例えば、次のごとき方法を採用すればよい。

すなわち、まず、抗原のCK-MM又はMBを採取するには、例えば、クリニカ ケミカ アクタ (Clinica Chimica Acta) 123巻、59～71頁 (1982) 記載の方法に従ってDEAEセファセルでCK-MMとMBを分離した後、CK-MMはCM-セルロース、フェニルセファロース、ブルーセファロースの各クロマトグラフィーを行うことにより、抗原として使用可能な精製CK-MMを得ることができる。

また、CK-MBは、DEAEセファセルで分離した後、フェニルセファロースによるクロマトグラフィーで抗原として使用可能な精製CK-MBを得ることができる。

抗原としては、全てのCK-MM又はMBを使用することができるが、臨床化学的には従来の抗血清がヒトのCKと交差する哺乳動物、例えば、ヒト、サル、ブタ、ウシ等の由来で、かつ被免疫動物とは異なる動物が好ましい。これらの抗原で、

哺乳動物、好ましくはマウス又はラットに免疫すればよい。抗原の使用量、投与部位、アジュバンドの使用等、免疫の方法は従来の抗血清を得る方法に準ずればよい。例えば、マウスを用いる場合、マウス1匹あたり1回につき0.001～10 μ g、好ましくは0.01～1 μ gのCK-MM又はMBを、初回はアジュバンド (例えば、フロイントの完全アジュバンド) とよく混合して、皮下、腹腔内等に投与し、3週間以上経過後、再びアジュバンド (例えば、フロイントの不完全アジュバンド) をよく混合して、皮下、腹腔内等に投与する。さらに、2週間以上経過後、CK-MM又はMBのみを静脈内、皮下、腹腔内等に投与して、十分免疫する。このようにして免疫された動物を、好ましくは最終免疫から2～4日後に殺し、リンパ球を採取する。リンパ球調製には、脾臓、リンパ節、末梢血等が用いられる。このリンパ球を培養液に懸濁状態にばくしておく。

一方、骨髓腫細胞 (ミエローマ) を用意する。このミエローマは、被免疫動物と同じ種由来のも

のを使用することが好ましい。さらに、そのミエローマは薬剤低抗性の変異株であることが好ましく、未融合のミエローマがハイブリドーマ選択培地で生育しないものが好ましい。最も一般には8-アザグアニン低抗性の細胞ラインが用いられる。これは、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ (Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) が欠損しており、選択培地の一種ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン (HAT) 培地に生育できない。また、使用するミエローマ自身が抗体を分泌しないものが望ましい。以上の点から、例えば、市販のマウスミエローマP3-X63-Ag8-6-5-3 (X63-6-5-3)、P3-X63-Ag8-U1 (P3U1)、ラットミエローマ210-RCY3-Ag1-2-3等を用いるのが好ましい。

このミエローマを血清、好ましくは牛胎児血清を含有するイーグル最少培地 (MEM)、RPMI 1640培地 (RPMI 1640) 等の培地中で培養する。

次に、MEM、RPMI 1640等の培地に上記で得たリンパ球及びミエローマをおのおの懸濁し、混合する。このときの混合比は任意に選択できるが、好ましくはリンパ球：ミエローマが細胞数で1：1～20：1、好ましくは5：1～10：1の比率を用いればよい。混合した細胞は、融合促進剤を用いて融合を行う。融合方法としては、例えば、イムノロジカル メソッズ 2巻、285頁 (Immunological Methods Vol. II, 1981, Academic Press) に従って行えばよい。融合促進剤としては、種々の高分子物質やウイルス等を用いることができるが、好ましくはポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルスを用いればよい。PEGは、平均分子量400～20,000のものが使用できるが、好ましくは1,000～7,500のものをを用いればよい。その使用濃度は、40～60 vol. %が好ましい。

融合させた細胞は、洗浄で融合促進剤を除去し、5～15 vol. %の血清を含むMEM又はRPMI 1640培地に懸濁し、96穴培養皿等に0.5～

5×10^3 / 穴の割合で分注する。さらに、各穴に選択培地（例えば、HAT培地）を加え、適宜選択培地を交換すれば、10～14日後には未融合のミエローマは死滅し、ハイブリドーマのみ生育する。因に、リンパ球は長時間生体外(in vitro)では生育できず、やはり10～14日後には死滅する。

抗体を産生しているハイブリドーマの検索方法としては、培養上澄液の阻害活性を知ることによって行うことができる。例えば、その上澄液をCK活性測定用試薬系（実施例1）の第1試薬に添加して、一定量のCK-MM活性を測定する。対照の上澄液無添加時の活性に比較して、低い値を示した上澄液の穴の株を選択すればよい。

以上の方法により、抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を創製することができる。

この方法に従って予めCK-MMで免疫したマウスの脾臓リンパ球とマウスのミエローマ細胞を融合して創製したハイブリドーマ細胞株の1種を、

ハイブリドーマCKH-1と命名した。この株を、昭和61年1月23日に財団法人発酵研究所に寄託の手続きを行い、IFO-50088として受け入れられた。このCKH-1は、 -120°C 以下ではほぼ永久的に凍結保存が可能であって、たえず頒布可能な状態に置かれている。

次に、このハイブリドーマCKH-1を用いて培養するが、その際、通常用いられる培地で培養することができる。例えば、牛胎児血清を5～20%含有するRPMI 1640又はMEMを培地として用い、 37°C 、炭酸ガス濃度5 vol.%含有空気下でよく増殖する。また、ミエローマの遺腫瘍性をも有しているので、生体内（例えば、同系の動物、ヌードマウスなど）で増殖し、抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体を産生することができる。

すなわち、このハイブリドーマ細胞株を培養することにより、抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体を大量に採取することができる。このモノクローナル抗体の採取方法には、大きく分けて2

通りの方法がある。1つは、培地を用い、フラスコ等の培養容器で培養し、その上澄液から抗体を採取する方法である。例えば、5～10 vol.%の血清を含むMEM又はRPMI 1640培地に、 $0.5 \sim 5 \times 10^3$ 個のハイブリドーマ細胞株を植えると、2～4日で10～20倍に生育し、その培養後の上澄液から抗体を採取する方法である。もう1つの方法は、このようにして培養容器で培養したハイブリドーマ細胞株を、同系の動物に接種する方法である。すなわち、ハイブリドーマ細胞株 $10^3 \sim 10^5$ 個を同系の動物の皮下又は腹腔内等に投与し、7～20日後ハイブリドーマ細胞株が増殖し、腫瘍が大きくなったときに、血清及び腹水を採取する方法である。腹腔内に投与する場合には、事前（3～7日前）に2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン等の鉱物油を投与すると、より多量の腹水が得られる。

このようにして得られた抗体は、必要に応じ精製して使用することができる。すなわち、硫酸分画、イオン交換体、CK-Mを固定化したアフィ

ニティクロマトグラフィーなどの、通常タンパク質に適用されうる手段を用いて精製することができる。

（実施例）

次に、本発明を実施例により具体的に説明する。
参考例1

クリニカ キミカ アクタ (Clinica Chimica Acta) 123巻, 59～71頁 (1982) 記載の方法に従って、まず、ブクの心臓をミンチにし、ホモゲナイズ30,000×gの遠心分離、70%のエタノール沈殿により粗酵素を得た。

次に、粗酵素を溶解、透析後、DEAE-セファセルカラム (pH7.5) により素通りするCK-MMと吸着するCK-MBとに分離し、CK-MB画分は食塩濃度を上げて溶出した。各画分は20%硫酸を含むトリスバッファーに透析し、フェニルセファロースカラムに吸着させて硫酸濃度を下げて溶出した。以上の操作により、精製された抗原のCK-MM及びMBを得た。

参考例2

8週令のマウスBa1b/c(日本クレアより入手。)に、参考例1で得た50 μ gのブタCK-MMを完全フロイントアジュバンド(半井化学より入手。)と1:1に混合乳化し、腹腔内に投与し、3週間後に50 μ gのブタCK-MMを静注して追加免疫し、3日後に脾臓を取り出し、MEM培地(半井化学より入手。)にほぐして懸濁、洗浄した。一方、マウスのミエローマX63 \cdot 6 \cdot 5 \cdot 3(京都大学より入手。)を2日前から培養し、対数増殖期にある細胞を遠心分離で集めた。脾細胞 10^6 個をミエローマX63 \cdot 6 \cdot 5 \cdot 3 10^7 と混合し、遠心によりペレットした後、37 $^{\circ}$ Cの水浴中で50%のPEG4000-RPMI1640(ギブコ社より入手。)1m ℓ を徐々に1分間で加え、さらに、1分間緩やかに攪拌後、9m ℓ のRPMI1640培地を徐々に加えて、PEG4000を希釈した。遠心分離によりPEG溶液を除去し、ペレットに10%牛胎児血清を含むHAT培地10m ℓ を加えて、96穴培養皿(スルク社より入手。)の各穴に0.1m ℓ ずつ分

注した。4、8、11日目の計3回にわたり半分量の培養液を捨て、新しいHAT培地を加えた。14日後には、96穴中56穴でハイブリドーマの生育が見られたので、その上澄液をCK活性測定用試薬系(実施例1)の第1試薬に添加して、一定量のCK-MM活性を測定した。対照の上澄液無添加時の活性と比較して、低い値を示した上澄液の穴の株を選択し、限界希釈法にてクローニングを行い、モノクローンのハイブリドーマCKH-1を得た。このCKH-1は、前記した細胞学的性質によく一致した。

参考例3

8週令のマウスBa1b/c(日本クレアより入手。)に、参考例1で得た50 μ gのブタCK-MBを完全フロイントアジュバンド(半井化学より入手。)と1:1に混合乳化し、腹腔内に投与し、3週間後に50 μ gのブタCK-MBを静注して追加免疫し、3日後に脾臓を取り出し、MEM培地(半井化学より入手。)にほぐして懸濁、洗浄した。以下、参考例2と同様にしてハイブリ

ドーマを作製してスクリーニングし、さらにクローニングして、モノクローンのハイブリドーマCKH-2を得た。このCKH-2は、前記した細胞学的性質によく一致した。

実施例1

参考例2で得たハイブリドーマCKH-1を、10%牛胎児血清を含むRPMI1640培地で培養し、細胞濃度 2×10^6 個/m ℓ となった培養物300m ℓ を遠心分離で上澄液を集め、50%飽和硫酸分画により粗抗体画分を分離し、透析後、ブロテインAセファロース(pH8.0)に吸着させ、pH4.0のクエン酸緩衝液で溶出して抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体3.2 μ gを得た。この抗体をCKA-1と称し、以下に示すCK活性測定用試薬系に添加してCK-MM活性に対する阻害度を測定した。

まず、バチルス・ステアロサーモフィルス由来のG6cK(生化学工業より市販。)1.4ユニット/m ℓ 、ロイコノストックメセンテロイデス由来のG6PDH(オリエンタル酵母工業社より購

入。)1.2ユニット/m ℓ 、ADP1.2mM、NADP0.75mM、グルコース25mM、AMP6.25mM、Ap5A12.5 μ M、N-アセチルシステイン12.5mM、酢酸マグネシウム12.5mM、アジ化ナトリウム10mM、EDTA2.5mM、イミダゾール-酢酸緩衝液(pH6.7)150mMよりなる第1試薬を調製し、次いで、CP100mM、アジ化ナトリウム10mM、トリス-酢酸緩衝液(pH8.5)25mMよりなる第2試薬を調製した。

上記の第1試薬に抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体CKA-10.5 μ gを添加し、その0.5m ℓ にCK-MM、MB又はBBを加えて光路長1cmのセルに入れ、15分間インキュベートし、次いで、第2試薬0.125m ℓ を加えて、セル室を同じく30 $^{\circ}$ Cの恒温に保った分光光度計にて、340nmの吸光度変化より残存CK活性を測定した。対照として、抗体を含まない第1試薬に同量のCK-MM、MB又はBBを加えて、以下同様に測定した。

その結果を表1に示す。

表1 CKA-1の阻害活性

アイソタイプ	抗体無添加時の活性 (u/l)	抗体添加時の活性 (u/l)	阻害率 (%)
CK-MM	210	48	77
CK-MB	204	124	39
CK-BB	196	194	1

(注) 値は各々3検体の平均値

表1に示したように、CKA-1はCK-Mサブユニットをよく阻害するが、Bサブユニットはほとんど阻害せず、前記した理化学的性質によく一致した抗体であった。

実施例2

参考例3で得たハイブリドーマ細胞株CKH-2を実施例1と同様に培養し、その上澄液500mlから抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体7.8mgを得た。この抗体をCKA-2と称し、参考例2と同様にCK活性測定用試薬系に添加して、

各CK活性に対する阻害率を測定した。

その結果を表2に示す。

表2 CKA-2の阻害活性

アイソタイプ	抗体無添加時の活性 (u/l)	抗体添加時の活性 (u/l)	阻害率 (%)
CK-MM	181	33	82
CK-MB	201	125	62
CK-BB	196	193	2

(注) 値は各々3検体の平均値

表2に示したように、CKA-2はCK-Mサブユニットをよく阻害するが、Bサブユニットはほとんど阻害せず、前記した理化学的性質によく一致した抗体であった。

(発明の効果)

本発明の抗CK-M活性阻害モノクローナル抗体は、大量に、しかも容易に、かつ安価に得ることができるので、免疫阻害法でCK-MBアイソザイムを簡便で感度よく測定することができる。

特許出願人 ユニチカ株式会社